

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program:  
Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:  
Molekulární biologie a biochemie organismů



Klára Klimešová

Recyklace sestřihových komplexů  
Recycling of spliceosomal complexes

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: doc. Mgr. David Staněk, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 3. 5. 2013

.....

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli doc. Mgr. Davidu Staňkovi, Ph.D. za jeho cenné rady a ochotu, se kterou mi pomohl. Moje poděkování dále patří všem ostatním členům Oddělení biologie RNA Ústavu molekulární genetiky AV ČR a mé rodině.

## Abstrakt

Ve většině lidských genů jsou kódující úseky (exony) přerušovány dlouhými nekódujícími sekvencemi (introny). Po přepisu genu do pre-mRNA musí být tyto introny velmi přesně vyštěpeny v procesu zvaném sestřih. Sestřih je zajišťován velmi složitým a dynamickým sestřihovým komplexem, který se skládá z pěti malých jaderných ribonukleoproteinových částic (snRNP) a řady sestřihových proteinů. Každá částice obsahuje jednu malou jadernou RNA a několik specifických proteinů a vzniká postupným procesem, který se odehrává v jádře i cytoplazmě. Závěrečné úpravy pak probíhají v jaderných Cajalových těliscích. Hotové částice nasedají v přesně daném pořadí na pre-mRNA a formují komplex, který katalyzuje dvě transesterifikační reakce potřebné k vystřížení intronu a spojení okolních exonů a následně se opět rozpadá na jednotlivé snRNP. Ribonukleoproteinové částice během sestřihu podstupují nejružnější změny jak v konformaci, tak v proteinovém složení. Proto musí před každým dalším kolem sestřihu projít recyklačními úpravami a vrátit se do stavu vhodného pro připojení k novému sestřihovému komplexu. Recyklační fázi sestřihového cyklu nicméně zatím obklopuje více otázek než odpovědí. Cílem této práce je pokusit se ve světle nových poznatků alespoň na některé z nich odpovědět.

## Klíčová slova

sestřihové snRNP, sestřihový komplex, pre-mRNA sestřih

## **Abstract**

Most human genes are composed of coding sequences (exons) that are interrupted by non-coding sequences (introns). After gene transcription into pre-mRNA, these introns have to be removed in a process called splicing. Splicing is mediated by a very complex and dynamic complex called the spliceosome, which consists of five small nuclear ribonucleoprotein particles (snRNPs) and numerous additional splicing proteins. Each particle contains single small nuclear RNA and a set of specific proteins. SnRNPs are assembled by a stepwise process that takes place both in the nucleus and the cytoplasm and final maturation steps occur in nuclear Cajal bodies. The mature snRNPs interact with pre-mRNA in an ordered pathway and form the spliceosome that catalyzes two trans-esterification reactions leading to intron excision and exons ligation. Subsequently, the spliceosome disassembles again into individual snRNPs that have undergone diverse conformational and compositional transformations during splicing. Thus, before the particles can participate in another round of splicing they have to go through recycling to recover their original form. However, currently the recycling phase of the splicing cycle is surrounded by more questions than answers. The purpose of this work is to discuss latest findings that shed some light on snRNP after-splicing regeneration.

## **Keywords**

spliceosomal snRNP, spliceosome, pre-mRNA splicing

# Obsah

Seznam zkratek.....	1
1 Úvod .....	2
2 Struktura sestřihových malých jaderných ribonukleoproteinů.....	4
3 Biogeneze snRNP.....	7
3.1 Biogeneze Sm snRNP.....	7
3.2 Biogeneze U6 snRNP .....	8
3.3 Cajalova tělíska .....	9
3.4 SART3 .....	10
3.5 Formování funkčních sestřihových snRNP .....	11
4 Sestřih pre-mRNA.....	14
5 Recyklace sestřihových komponent .....	19
5.1 Role SMN v recyklaci .....	22
5.2 Minoritní sestřihové komplexy .....	23
6 Závěr.....	24
Přehled použité literatury .....	26

## Seznam zkratek

$\gamma$ -m-P <sub>3</sub>	$\gamma$ -monomethyl triphosphate	$\gamma$ -monomethyltrifosfát
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
CB	Cajal body	Cajalovo tělísko
CBC	Cap binding complex	čepičku vázající komplex
gem	Gemini of Cajal bodies	blíženec Cajalových tělísek
GTP	guanosine triphosphate	guanosintrifosfát
HAT	half a TPR	polovina TPR
HIV-1	Human immunodeficiency virus 1	virus lidské imunodeficiency 1
IGC	interchromatin granule cluster	mezichromatinový granulární shluk
LSm	Like Sm	podobný Sm
m <sub>3</sub> <sup>2,2,7</sup> G	2,2,7-trimethyl guanosine	2,2,7-trimethylguanosin
m <sup>7</sup> G	7-methyl guanosine	7-methylguanosin
NTC	Nineteen complex	Prp19 komplex
NTR	NTC related	související s NTC
PHAX	Phosphorylated adaptor for RNA export	fosforylovaný adaptor pro export RNA
RRM	RNA recognition motif	RNA rozpoznávající motiv
SART3	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3	antigen karcinomu dlaždicových buněk rozpoznávaný T-buňkami 3
SMN	Survival of motor neuron	protein pro přežití motorických neuronů
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein particle	malá jaderná ribonukleoproteinová částice
TPR	tetratricopeptide repeat	tetratricopeptidová repetice

# 1 Úvod

Lidský genom ukrytý v jaderné DNA má v haploidní formě 3,08 miliard párů bází a obsahuje přes 20 000 genů kódujících proteiny (přesná čísla se liší podle použité metody výpočtu a definice genu) rozmístěných na 22 tělních a 2 pohlavních chromozomech. Tyto geny jsou podle centrálního dogmatu molekulární biologie semikonzervativně replikovány a exprimovány přepisem do mRNA a následnou translací do proteinů. Pro eukaryotické buňky je typické, že nově transkribovaná molekula RNA vzniká jako pre-mRNA a kromě žádoucích kódujících úseků, exonů, obsahuje také mnohem delší nekódující introny, které je třeba vystříhnout pomocí sestřihového komplexu.

Typický lidský gen se skládá z 8 exonů dlouhých 120 bp a proložených introny o délce asi 1 500 bp. Některé geny ale tato čísla výrazně překonávají, například gen pro nejdelší lidský protein titin je složen z 312 exonů. Už tak velmi složitý proces vystřížení intronů z pre-mRNA je ještě ztížen existencí tzv. alternativního sestřihu, při kterém jsou do výsledné mRNA zařazeny většinou jen některé exony a v závislosti na jejich výběru vznikají z jednoho genu různé proteiny. Tímto způsobem je efektivně zvyšována velikost lidského proteomu. Navíc bylo pozorováno, že některé krátké geny se můžou vyskytovat v intronech větších genů, a to buď na komplementárním, nebo přímo na kódujícím vlákně, a někdy dokonce obsahují vlastní introny. Sestřih musí být v takových případech neuvěřitelně komplexní (Lander et al, 2001; Scherer, 2008).

Jak již bylo zmíněno, sestřih je v lidských buňkách zajišťován sestřihovým komplexem. Jde o velice dynamický a složitý útvar, který se skládá z pěti molekul malých jaderných RNA tvořících katalytické jádro komplexu a více než stovky proteinů. Některé z těchto proteinů jsou navázané okolo jednotlivých RNA a společně formují malé jaderné ribonukleoproteinové částice, což jsou hlavní podjednotky komplexu, jiné fungují jako samostatné sestřihové faktory. Asi 0,1 % intronů je specificky vystřihováno pomocí minoritního sestřihového komplexu (Levine & Durbin, 2001; Scherer, 2008), který provádí sestřih stejným způsobem jako běžný majoritní komplex, ale mírně se liší strukturou jednotlivých ribonukleoproteinových částic. Původ ani evoluční význam minoritního komplexu zatím není známý, zdá se však, že mnoho původně minoritních intronů bylo postupně převedeno na majoritní (Burge et al, 1998). Přesto některé z nich přetrvaly až do dneška. Jedno z možných vysvětlení nabízí



fakt, že minoritní systém sestřihuje pre-mRNA výrazně pomaleji než majoritní. Není jasné, jestli je zpomalení dáno samotnou katalýzou reakce nebo pouze nedostatkem sestřihových komplexů, každopádně by mohlo být využito k regulaci genové exprese (Patel et al, 2002).

Ribonukleoproteinové podjednotky obou komplexů jsou syntetizovány postupně, v několika krocích, které se odehrávají v různých buněčných kompartmentech a zcela nezávisle na ostatních sestřihových faktorech. Hotové částice poté nasedají ve striktně daném pořadí na pre-mRNA a pomocí změn ve své konformaci i složení zajišťují reakci, během které je vyštěpen intron a okolní exony spojeny. V průběhu sestřihu a po jeho dokončení jsou jednotlivé faktory i částice zase uvolňovány. Z toho vyplývá, že každý komplex je schopen katalyzovat jen jednu reakci a sestřihové komponenty je pak třeba recyklovat a připravit na další sestřih.

V této práci bych se chtěla věnovat biogenezi sestřihových ribonukleoproteinů, jejich transformaci během sestřihu pre-mRNA a zvláště pak jejich regeneraci před dalším kolem sestřihu. Procesy popisované v následujících kapitolách jsou platné pro lidské buňky, i když část z nich byla objasněna nejprve na kvasinkových modelech. U mnoha jiných ale naopak nebyla pozorována žádná homologie se sestřihovými komplexy kvasinek a není proto možné tyto dva systémy zaměňovat nebo na nich učiněné objevy zobecňovat.

## 2 Struktura sestřihových malých jaderných ribonukleoproteinů

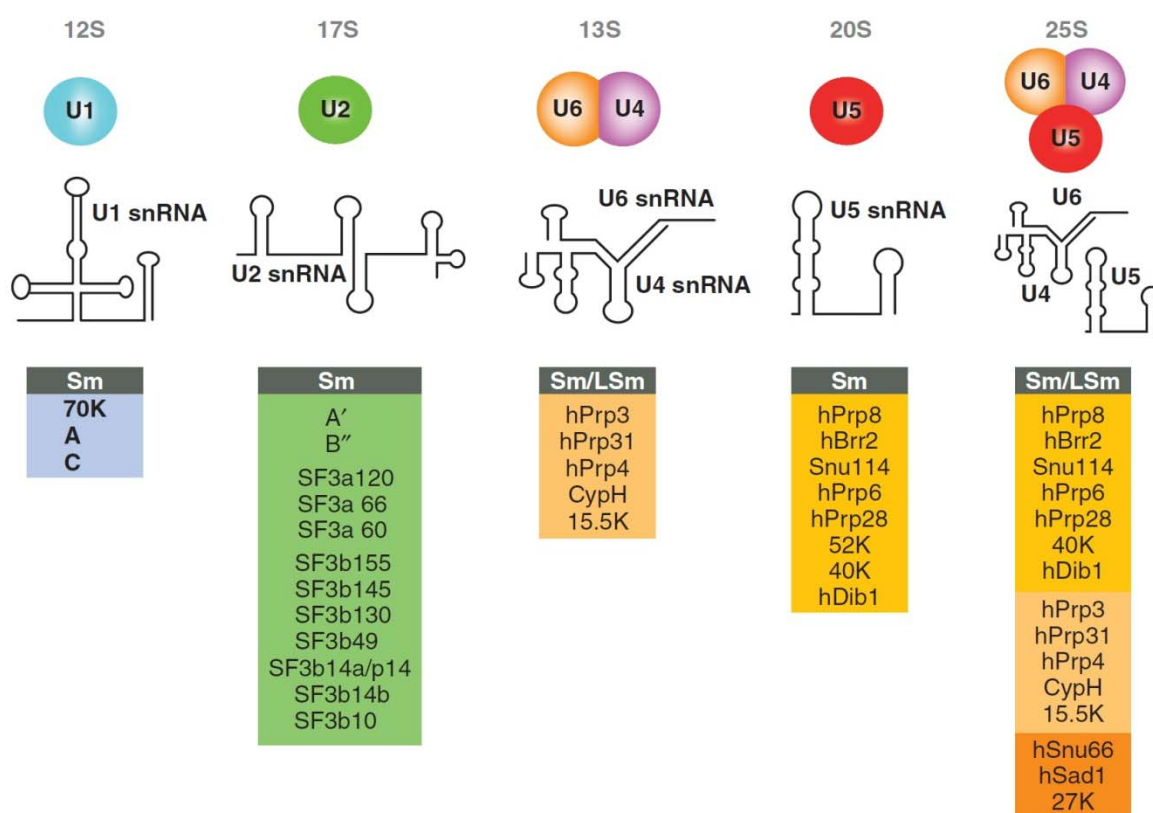
Sestřihové malé jaderné ribonukleoproteinové částice (snRNP) jsou hlavními komponentami majoritních (typu U2) i minoritních (typu U12) sestřihových komplexů. Jak již jejich název napovídá, jde o částice složené ze sady proteinů a jedné molekuly malé jaderné RNA (snRNA) bohaté na uridin, která je specifická pro každou částici. Od typu snRNA se odvíjí také jejich označení U1, U2, U4, U5 a U6 snRNP, respektive U11, U12, U4atac, U5 a U6atac snRNP u minoritních sestřihových komplexů. Byly nalezeny i další U snRNP (např. U3 a U7), ty se však nepodílí na sestřihu pre-mRNA.

U1, U2, U4 a U5 snRNA jsou přepisovány, stejně jako pre-mRNA, RNA polymerázou II a na 5' konci nesou 2,2,7-trimethylguanosinovou čepičku ( $m_3^{2,2,7}G$ ) (Reddy et al, 1974), kterou získávají během maturace v cytoplazmě. Dalším společným znakem je přítomnost Sm místa Pu-A-U<sub>3-6</sub>-G-Pu (Pu značí purin) obklopeného dvěma vlásenkami (Branlant et al, 1982). Zde se váže heteroheptamerický prstenec tvořený Sm proteiny B/B', D1, D2, D3, E, F a G (Hermann et al, 1995; Kambach et al, 1999; Salgado-Garrido et al, 1999). SmB a SmB' vznikají z jednoho genu alternativním sestřihem (Chu & Elkon, 1991).

U6 snRNA se liší od ostatních strukturou i způsobem maturace. Přepisována je RNA polymerázou III a na 5' konci má  $\gamma$ -monomethyltrifosfátovou čepičku ( $\gamma$ -m-P<sub>3</sub>) (Singh & Reddy, 1989). Místo Sm heteroheptameru je U6 snRNA obklopena obdobným prstencem LSm2-8 (Like Sm) proteinů navázaných na oligoU úseku 3' konce (Achsel et al, 1999; Mayes et al, 1999; Salgado-Garrido et al, 1999; Vidal et al, 1999). Na rozdíl od Sm proteinů dokážou LSm zaujmout prstencovitou strukturu i v nepřítomnosti RNA (Achsel et al, 1999). Navíc se LSm2-7 můžou vázat také na LSm1 a vytvořit cytoplazmatický heteroheptamer účastnící se degradace mRNA (Bouveret et al, 2000; Salgado-Garrido et al, 1999). Bylo ukázáno, že akumulace LSm2-7 v jádře je kontrolována přítomností LSm8 a vazbou kompletního LSm2-8 komplexu na U6 snRNA (Novotný et al, 2012).

Kromě právě popsaných Sm (respektive LSm) proteinů a RNA nese každá snRNP ještě sadu vlastních specifických proteinů. Mezi jednotlivými snRNP existuje variabilita jak ve struktuře, tak v množství těchto proteinů (Obr. 1). Pouze U1 a U2 snRNP jsou schopné začlenit se do sestřihového komplexu jako samostatné funkční podjednotky. U4 a U6 snRNP musí nejdříve podstoupit proces probíhající v Cajalových tělískách v jádře, během kterého

dojde ke spárování jejich snRNA a vytvoření U4/U6 di-snRNP (Bringmann et al, 1984; Staněk et al, 2003). K tomuto komplexu se poté pomocí protein-proteinových interakcí připojuje U5 snRNP za vzniku U4/U6·U5 tri-snRNP (Black & Pinto, 1989). Během formování tri-snRNP se některé proteiny uvolňují, jiné se naopak specificky připojují a vzniká mezi nimi složitá síť interakcí (Liu et al, 2006; Vidal et al, 1999). V rámci sestřihového komplexu dokáže U6 snRNA párovat i s U2 snRNA (Hausner et al, 1990) – jde o zcela zásadní krok pro vystřížení intronu.



Obr. 1: Proteinové složení majoritních sestřihových snRNP a sekundární struktura jejich snRNA. U1, U2 a U5 snRNP obsahují jednu sadu Sm proteinů, U4/U6 di-snRNP má jeden Sm a jeden LSm prstenec a U4/U6·U5 tri-snRNP obsahuje dvě sady Sm a jednu LSm proteinů. Převzato z Will & Lührmann, 2011.

Podobný mechanismus funguje také u minoritního sestřihového komplexu, kde tímto způsobem vzniká U4atac/U6atac·U5 tri-snRNP. Oba typy tri-snRNP dokonce obsahují stejné proteiny (Schneider et al, 2002). Výraznější rozdíl byl ovšem zjištěn u U11 a U12 snRNP, které se pomocí protein-proteinových interakcí formují do U11/U12 di-snRNP (Wassarman

& Steitz, 1992). U majoritních U1 a U2 snRNP k interakcím, i když nepřímým a pouze krátkodobým, sice také dochází, ale až během samotného sestřihu. Kromě Sm proteinů a SF3b komplexu nemají U11 a U12 se svými majoritními protějšky žádnou další součást společnou, naopak u nich bylo identifikováno několik zcela specifických proteinů (Will et al, 2004).

V posledních letech se podařilo některé z těchto sestřihových komponent krystalizovat a detailně určit jejich strukturu. Konkrétně se jedná o téměř kompletní U1 snRNP (Pomeranz Krummel et al, 2009; Weber et al, 2010), část U4 snRNP obsahující kromě U4 snRNA proteiny 15,5K, hPrp31 (Liu et al, 2007) a Sm prstenec (Leung et al, 2011), U2A' a U2B'' proteiny navázané na U2 snRNA (Price et al, 1998) a U2 specifický SF3a komplex, který byl sice izolován z kvasinek, ale vykazuje vysokou homologii s lidskými SF3a proteiny (Lin & Xu, 2012). Struktura SF3b komplexu je oproti tomu známá zatím pouze z analýz kryoelektronovou mikroskopií (Golas et al, 2003). Touto metodou byla objasněna také struktura U11/U12 di-snRNP a bylo zjištěno, že SF3b mění před připojením k částici konformaci (Golas et al, 2005).

Krystalizace U1 a U4 snRNP pomohla objasnit mimo jiné princip vazby Sm prstence na snRNA – každý z Sm proteinů pomocí specifických motivů rozpoznává a váže jeden nukleotid Sm místa (Leung et al, 2011; Weber et al, 2010). Kromě maturovaného Sm prstence byly krystalizovány také prekursor, které vznikají při jeho formování (Grimm et al, 2013; Kambach et al, 1999; Zhang et al, 2011). U5 snRNP, U4/U6 di-snRNP a U4/U6·U5 tri-snRNP se prozatím krystalizovat nepovedlo, ale byly podrobně zkoumány kryoelektronovou mikroskopií (Sander et al, 2006). Dále se podařilo připravit a analyzovat krystaly několika U5 specifických proteinů, např. Prp8 nebo Brr2, a určit jejich strukturu (Galej et al, 2013; Pena et al, 2009; Zhang et al, 2009).

### 3 Biogeneze snRNP

Před tím než se ribonukleoproteinové částice stanou plně funkčními a schopnými zapojit se do sestřihu, musí absolvovat postupnou maturaci odehrávající se jak v jádře, tak v cytoplazmě. Jednotlivé kroky mají vždy striktní pořadí. Jak již bylo naznačeno výše, U6 snRNP maturují odlišným způsobem než ostatní sestřihové snRNP.

#### 3.1 Biogeneze Sm snRNP

U1, U2, U4 a U5 snRNA jsou, stejně jako ostatní transkripty RNA polymerázy II, opatřeny 7-methylguanosinovou čepičkou ( $m^7G$ ). Ta je rozpoznávána CBC komplexem (Cap binding complex), na který se dále váže fosforylovaný exportní faktor PHAX (Phosphorylated adaptor for RNA export) (Izaurre et al, 1995; Ohno et al, 2000; Segref et al, 2001). Celý komplex je poté pomocí exportního receptoru Xpo1/CRM1 a RanGTP transportován přes jadernou membránu do cytoplazmy (Ohno et al, 2000). Zde je PHAX okamžitě defosforylován (Kitao et al, 2008; Ohno et al, 2000), RanGTP se hydrolyzuje a na snRNA se navazuje důležitý maturační faktor, SMN komplex (Survival of motor neuron) (Massenet et al, 2002).

SMN komplex obsahuje SMN, unrip a sedm Gemin proteinů (Gemin2-8), ale může asociovat ještě s mnoha dalšími (Meister et al, 2000), a je zcela zásadní pro biogenezi a funkci sestřihových snRNP (Pellizzoni et al, 1998). Nachází se v cytoplazmě a nukleoplazmě, kde je hlavní komponentou jaderných tělísek nazývaných gemy (Gemini of Cajal bodies). Jde o 0,1 až 1  $\mu m$  velké struktury, často asociované nebo v blízkosti Cajalových tělísek (Liu & Dreyfuss, 1996). SMN pomocí své tudor domény interaguje mimo jiné s methylovanými argininy na C-koncích Sm proteinů (Côté & Richard, 2005; Selenko et al, 2001) – mutace v tudor doméně proto způsobuje vážné narušení maturace snRNP a má za následek autozomálně recesivní spinální svalovou atrofii (Lefebvre et al, 1995; Pellizzoni et al, 1999; Selenko et al, 2001).

V okamžiku, kdy SMN komplex nasedá na exportovanou snRNA, přináší s sebou již navázané Sm proteiny ve formě dimerů B/B'·D3 a D1·D2 a trimeru E·F·G a pomáhá jim ve správném pořadí vytvořit prstencovitý komplex okolo Sm místa (Pellizzoni et al, 2002; Raker et al, 1999; Raker et al, 1996; Shpargel & Matera, 2005). Tím však funkce SMN zdaleka nekončí a komplex zůstává pevně navázán na vznikající částici po celou dobu cytoplazmatické

fáze maturace a částečně i během jaderné fáze (Massenet et al, 2002; Meister et al, 2000; Narayanan et al, 2002). Oproti tomu CBC a PHAX jsou uvolněny a vrací se do jádra, kde zajišťují další kolo exportu snRNA (Segref et al, 2001).

Odhalená m<sup>7</sup>G čepička se stává substrátem pro trimethylguanosin syntázu 1 rekrutovanou SMN komplexem a vzniká výsledná m<sub>3</sub><sup>2,2,7</sup>G čepička na 5' konci molekuly (Lemm et al, 2006; Massenet et al, 2002; Mouaikel et al, 2003; Narayanan et al, 2002), zatímco 3' konec je zkracován. Tímto krokem jsou cytoplazmatické úpravy kompletní a částice může být importována zpět do jádra (Narayanan et al, 2004). Import je zprostředkován vazbou SMN na importin β a snurportin 1, které jsou pro tento proces dostačující. Transport tedy probíhá nezávisle na energii a přítomnosti Ran (Huber et al, 2002; Narayanan et al, 2002). Po příchodu do jádra je komplex snRNP·SMN cílen do Cajalových tělísek, kde dochází k dalším maturačním úpravám (Carvalho et al, 1999; Sleeman & Lamond, 1999).

Před několika roky byly v oocytech *Drosophila melanogaster* nalezeny cytoplazmatické útvary nazvané U (U snRNP) tělíška. Protože jsou v těchto strukturách kolokalizovány sestřihové Sm snRNP a SMN, bylo navrženo, že by mohly sloužit ke skladování snRNP před jejich importem do jádra nebo že by v nich dokonce mohla probíhat celá cytoplazmatická fáze biogeneze. U tělíška bývají navíc asociována s P (procesivními) tělísky, která slouží k degradaci mRNA. Je tedy možné, že jsou snRNP uvolňovány a dále využívány v závislosti na míře degradace mRNA. Další možnost je, že jsou v P tělíškách degradovány i snRNP a tím se udržuje rovnováha mezi jejich tvorbou a rozkladem (Buckingham & Liu, 2011; Cauchi et al, 2010; Liu & Gall, 2007). Zda jsou tyto úvahy správné a zda jsou U tělíška přítomna i v buňkách dalších organismů, však musí být ještě experimentálně ověřeno.

### 3.2 Biogeneze U6 snRNP

Nově transkribovaná U6 snRNA podstupuje velmi podobné maturační modifikace jako Sm snRNA, na rozdíl od nich ale vůbec neopouští jádro. Místo toho je snRNA ihned cílena do jadérka, kde je nejprve upravován její 3' konec – je prodlužován připojením oligoU sekvence U6 specifickou terminální uridyl transferázou (Trippe et al, 2006) a záhy zase zkracován U6 specifickou 3' exonukleázou (Booth & Pugh, 1997). Exonukleáza štěpí vazbu mezi 3' fosfátem a 5' OH, takže vzniká 3' koncový fosfát, který je ještě cyklizován (Gu et al, 1997) a jehož

přítomnost výrazně zvyšuje afinitu U6 snRNA k LSM proteinům (Licht et al, 2008). Na 5' konec molekuly se přidává methylová skupina a vytváří se  $\gamma$ -monomethyltrifosfátová čepička (Shimba & Reddy, 1994).

Protože LSM dokážou formovat výsledný heteroheptamer samostatně, je velmi pravděpodobné, že jejich nasednutí probíhá pouze v jednom kroku (Achsel et al, 1999). Nakonec musí dojít ještě k modifikacím některých bází. Konkrétně jde o pseudouridylaci a 2'-O-methylaci řízenou malými jadérovými RNA (snoRNA) (Ganot et al, 1999). Hotová U6 snRNP je transportována do Cajalových tělísek, kde se setkává s ostatními sestřihovými snRNP.

### 3.3 Cajalova tělíska

Cajalova tělíska (CB) hrají v biogenezi a následné recyklaci sestřihových ribonukleo-proteinů ústřední roli. Jsou to bezmembránové a velmi proměnlivé jaderné útvary měřící 0,5 až 1  $\mu\text{m}$  v průměru. Za jejich jediný specifický protein je považován 80 kDa velký coilin (Raška et al, 1991). Kromě nejrozličnějších (nejen sestřihových) snRNP a s nimi spojených proteinů jsou v CB dále akumulovány například některé transkripční faktory nebo jadérové proteiny fibrillarin a Nopp140.

CB se chovají velmi dynamicky. V závislosti na konkrétních podmínkách nebo fázi buněčného cyklu se mění nejen jejich velikost, ale i počet (Carmo-Fonseca et al, 1993). V některých buněčných typech dokonce zcela chybí, přesto není životaschopnost těchto buněk nijak ovlivněna. To se dá vysvětlit tím, že coilin sice je výrazně nahloučen v tělíscích, nicméně většina coilinu v jádře je volně v nukleoplazmě, a to jak u buněk s CB, tak i u těch, které je postrádají (Carmo-Fonseca et al, 1993). Z toho vyplývá, že hlavní funkcí Cajalových tělísek je usnadnit a urychlit maturaci a recyklaci sestřihových komponent zvýšením jejich lokální koncentrace (Klingauf et al, 2006; Staněk & Neugebauer, 2004). To je také důvod, proč jsou CB časté hlavně v dělících se buňkách s vysokou mírou genové exprese. Pomocí matematického modelování bylo ukázáno, že CB nejlépe zachycují snRNP, pokud jsou 3 až 4 na jádro, což je zároveň jejich obvyklý pozorovaný počet. Za takových podmínek probíhá třeba formování U4/U6 di-snRNP nebo U4/U6·U5 tri-snRNP přibližně 10× rychleji v CB než v okolní nukleoplazmě (Klingauf et al, 2006; Novotný et al, 2011).

Přestože je coilin pro život důležitý, není úplně nepostradatelný. K. E. Tuckerovi a jeho kolegům se podařilo vytvořit knockoutované myši postrádající coilin a někteří homozygotní mutanti dokázali přežít, i když jejich počet byl značně redukován. V buňkách těchto jedinců byla nalezena tzv. zbytková Cajalova tělíska, která měla stejný tvar a velikost jako klasická CB a obsahovala jejich běžné součásti, např. fibrillarin a Nopp140. S absencí coilinu ovšem zmizela i schopnost tělísek asociovat sestřihové snRNP a SMN komplex (Tucker et al, 2001).

Coilin, stejně jako Sm proteiny, obsahuje symetricky dimethylované argininy a využívá je i ke stejnému účelu – vazbě SMN komplexů importovaných z cytoplazmy (Hebert et al, 2002). SMN s sebou přináší stále ještě navázané Sm snRNP, které pomocí Sm prstence interagují s C-koncovou doménou coilinu a formuje se tak komplex, jehož uspořádání zřejmě umožňuje uvolnění SMN (Xu et al, 2005). SMN je poté nejspíše recyklován zpět do cytoplazmy, kde zajišťuje biogenezi dalších snRNP. Kromě těchto vazeb interagují molekuly coilinu i samy mezi sebou, v rámci Cajalových tělísek i mimo ně (Dundr et al, 2004; Staněk & Neugebauer, 2004).

Cajalova tělíska jsou místem závěrečných modifikací sestřihových Sm snRNP. Jejich snRNA musí být 2'-O-methylována a pseudouridylována, což zajišťují malé CB specifické scaRNA (Darzacq et al, 2002; Jády et al, 2003). ScaRNA se velmi podobají snoRNA, které vykonávají stejnou funkci v maturaci U6 snRNA (Darzacq et al, 2002). Úpravy bází sice probíhají v CB, ale coilin se na nich přímo nijak nepodílí (Jády et al, 2003). Všechny další modifikace se již dějí na úrovni připojení proteinů specifických pro jednotlivé částice a formování složených snRNP.

### 3.4 SART3

SART3 (Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3), označovaný také p110, Tip110 nebo hPrp24, je esenciální protein účastnící se mnoha různých a zřejmě nesouvisejících buněčných procesů. Byl identifikován jako antigen schopný indukovat imunitní reakci cytotoxických T-lymfocytů proti rakovinným buňkám (Yang et al, 1999). Dále SART3 interaguje s Tat proteinem, transkripčním aktivátorem viru HIV-1, čímž umožňuje virovou expresi a replikaci (Liu et al, 2002). Co se týče funkce SART3 v sestřihu pre-mRNA,



byla pozorována jeho vazba na sestřihový faktor RNPS1, která má vliv na alternativní sestřih (Harada et al, 2001). Zde bych se ale chtěla zaměřit hlavně na roli SART3 ve formování U4/U6 ribonukleoproteinů.

N-koncová polovina molekuly SART3 je tvořena HAT doménou skládající se ze sedmi HAT (half a TPR) motivů, za ní se nachází jaderný lokalizační signál a v oblasti C-konce jsou dva RRM motivy schopné vázat RNA a vysoce konzervovaná CT10 doména (Bell et al, 2002; Liu et al, 2002). Všechny tyto oblasti jsou podstatné pro maturaci a recyklaci U6 částic. RRM doména přímo váže U6 snRNA, zatímco CT10 interaguje s LSm proteiny a je důležitá pro transport snRNP do Cajalových tělísek (Licht et al, 2008; Medenbach et al, 2004; Staněk et al, 2003; Vidal et al, 1999). Samotné cílení SART3 do CB však zajišťuje HAT doména (Staněk et al, 2003).

### **3.5 Formování funkčních sestřihových snRNP**

Po vstupu SART3-U6 snRNP komplexu do Cajalových tělísek se SART3 naváže na coilin (Novotný et al, 2011) a pravděpodobně dochází i k interakci mezi coilinem a LSm prstencem (Xu et al, 2005). Proto se SART3 neakumuluje ve zbytkových CB bez coilinu (Staněk et al, 2003). Transportem U6 částice do CB ale role SART3 v biogenezi snRNP nekončí, jeho přítomnost je důležitá také pro následné sestavení U4/U6 di-snRNP (Bell et al, 2002; Staněk & Neugebauer, 2004; Staněk et al, 2003).

U4 snRNP se zcela nezávisle na U6 snRNP dostává do Cajalových tělísek (Staněk & Neugebauer, 2004), kde jejich snRNA párují (Bringmann et al, 1984). Na 5' vlásečku U4 snRNA se váže 15,5K protein (Nottrott et al, 1999), není ale jisté, jestli se interakce tvoří ještě před vstupem do CB nebo až v nich. 15,5K protein zprostředkovává vazbu hPrp31 (61K) na U4 snRNA a heterotrimeru CypH-hPrp4-hPrp3 (20K-60K-90K) na U4/U6 snRNA duplex (Liu et al, 2006; Nottrott et al, 1999; Nottrott et al, 2002) a hPrp3 navíc asociuje s HAT doménou SART3 (Medenbach et al, 2004). Tím je SART3-U4/U6 di-snRNP kompletní a může integrovat U5 ribonukleoprotein.

U5 snRNP vstupuje do tri-snRNP komplexu jako 20S částice obsahující osm specifických proteinů. Jedním z nich je hPrp6 (102K), který zajišťuje interakci s di-snRNP specifickým hPrp31 a připojuje tak U5 snRNP pomocí protein-proteinových vazeb (Makarova

et al, 2002; Schaffert et al, 2004). Zároveň s tímto krokem se uvolňuje SART3 (Bell et al, 2002) a U5 specifický 52K protein, který nejspíše pomáhá hPrp6 správně se navázat na hPrp31 (Laggerbauer et al, 2005). Uvolnění SART3 během formování U4/U6·U5 tri-snRNP potvrzuje mimo jiné i jeho velmi rychlá disociace z Cajalových tělísek – je o poznání rychlejší než v případě Sm proteinů (Dundr et al, 2004). Nakonec jsou inkorporovány ještě tři tri-snRNP specifické proteiny podstatné pro zařazení funkční částice do sestřihového komplexu (Makarova et al, 2002). Protein hSnu66 (110K) kromě toho zprostředkovává společně s hPrp6 kontakt mezi U5 specifickými a U4/U6 specifickými proteiny (Liu et al, 2006). Celý tento proces probíhá velmi rychle, průměrně se v jednom Cajalově tělísku vytvoří 230 U4/U6·U5 částic za minutu (Novotný et al, 2011).

Na rozdíl od poměrně dobře popsané tri-snRNP, visí nad maturací U1 snRNP velký otazník. U1 je s pouhými třemi specifickými proteiny nejjednodušší ribonukleoproteinovou podjednotkou sestřihového komplexu. Proteiny U1-70K a U1-A se navazují přímo na vlásenky U1 snRNA, zatímco U1-C asociuje pomocí protein-proteinových interakcí s nově vytvořeným vazebným místem (Nelissen et al, 1994). Není však jasné, kde v jádře k těmto maturačním krokům dochází. Jako jediná ze sestřihových částic se totiž U1 neakumuluje v Cajalových tělíscích (Matera & Ward, 1993) a pokud jimi vůbec prochází, je její vazba na coilin pouze velmi slabá nebo krátkodobá (Xu et al, 2005).

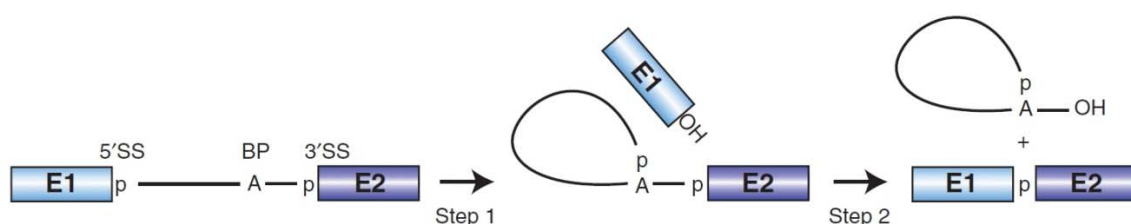
Oproti tomu U2 snRNP během své biogeneze využívá prostředí Cajalových tělísek (Nesic et al, 2004; Tanackovic & Krämer, 2005) a vyskytuje se v nich postupně v několika formách. Nejdříve jsou k snRNA s Sm prstencem stabilně připojeny U2A' a U2B'' proteiny za vzniku 12S částice, poté přichází SF3b komplex složený z osmi různých proteinů a vytváří 15S částici. Nakonec probíhá interakce s heterotrimerem SF3a proteinů, který je formován již v cytoplazmě (Nesic et al, 2004). Zároveň s integrací SF3a komplexu je uvolněn SF3b12S protein sloužící ke správnému formování 15S snRNP (Will et al, 2002). S výslednou 17S částicí dále asociuje ještě několik specifických proteinů důležitých pro sestřih (Will et al, 2002).

Kompletní a připravené sestřihové částice se koncentrují do mezichromatinových granulárních shluků (IGC) v nukleoplazmě (Nesic et al, 2004; Sleeman & Lamond, 1999). Pokud je knockdownem hPrp31 nebo hPrp6 zablokována tvorba U4/U6·U5 tri-snRNP, skladují se zde také nevyužité U5 snRNP (Schaffert et al, 2004). Navíc se kromě samotných

snRNP v IGC nachází i mnoho jiných sestřihových faktorů (Sleeman & Lamond, 1999). Podle donedávna uznávaného modelu čekají komponenty sestřihového komplexu v IGC na signál, po němž jsou rekrutovány do perichromatinových fibril, kde probíhá sestřih pre-mRNA (Misteli et al, 1997). Perichromatinová fibrila většinou obklopují okraje IGC a společně vytvářejí typické jaderné skvrny. V poslední době se však ukazuje, že sestřihové proteiny a snRNP nejsou takto striktně rozmístěny v jednotlivých kompartmentech, naopak se Brownovou difuzí neustále a nezávisle na transkripci pohybují napříč celým jádrem. Během tohoto nekoordinovaného pohybu náhodně vstupují do jaderných skvrn, kde jsou různými interakcemi zadržovány v řádech několika sekund (Huranová et al, 2010; Rino et al, 2007).

## 4 Sestřih pre-mRNA

Sestřihový komplex je velmi dynamická a flexibilní struktura, která nenasedá na pre-mRNA jako celek, ale postupně se na ní skládá z jednotlivých podjednotek a samostatných proteinů. Jde o velice složitý proces, do kterého se každý sestřihový faktor zapojuje v přesně stanovený okamžik a stejně tak ho zase opouští. Vše navíc probíhá na základě náhodných, přechodných interakcí, poté co snRNP při svém putování nukleoplazmou narazí na substrát v podobě pre-mRNA (Huranová et al, 2010). Podjednotky komplexu rozeznávají intron pomocí několika krátkých konzervovaných sekvencí – jsou to 5' a 3' sestřihová místa, místo větvení a polypyrimidinový úsek v blízkosti 3' sestřihového místa. K odstranění intronu z pre-mRNA jsou zapotřebí dvě transesterifikační reakce. Nejprve 2' OH skupina adenosinu v místě větvení atakuje 5' sestřihové místo, čímž se intron odpojí od 5' exonu za vzniku lasovitého útvaru – lariátu. Ve druhém kroku je 3' sestřihové místo napadeno uvolněnou 3' OH skupinou 5' exonu, oba exony se spojují a lariát je vyštěpen z transkriptu (Obr. 2).



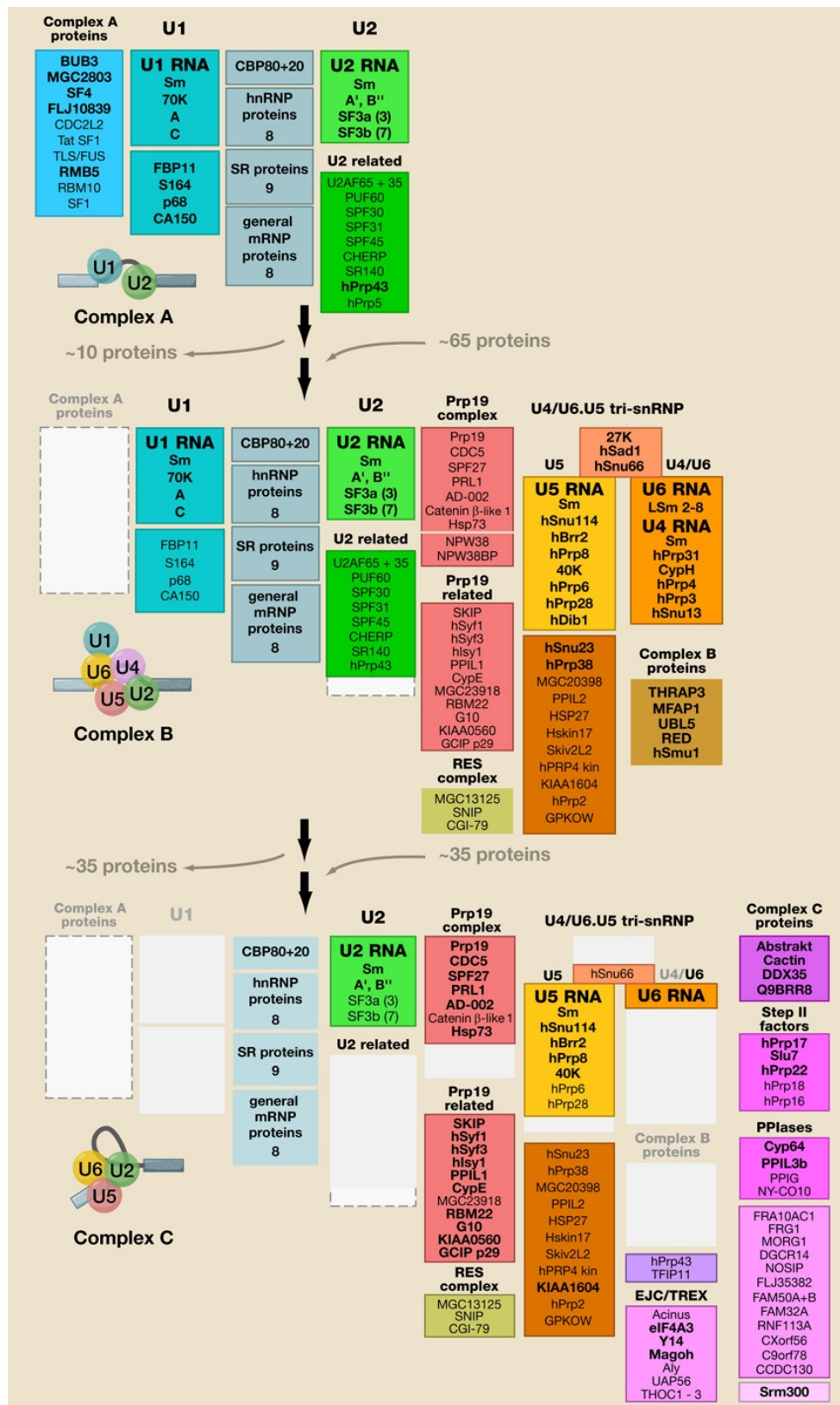
Obr. 2: Schematické znázornění obou transesterifikačních reakcí vedoucích k vyštěpení intronu. Obdélníčky E1 a E2 představují exony, plná čára intron, 5'SS a 3'SS jsou sestřihová místa a BP místo větvení. Převzato z Will & Lührmann, 2011.

Jako první podjednotka budoucího komplexu na molekulu pre-mRNA nasedá U1 snRNP a její snRNA páruje s 5' sestřihovým místem. Na polypyrimidinový úsek a místo větvení se vážou proteiny SF1 a U2AF65, SF1 však nejspíše není esenciální pro sestřih všech genů (Tanackovic & Krämer, 2005). Obsazeno je i 3' sestřihové místo, a to U2AF35 faktorem tvořícím heterodimer s U2AF65. Nakonec je za pomoci hPrp5 slabými vazbami připojena U2 snRNP a tvoří se sestřihový komplex E (Makarov et al, 2012; Will et al, 2002). Ten se podařilo purifikovat a překvapivě v něm byla zjištěna přítomnost SMN komplexu, který pravděpodobně hraje roli v asociaci U2 nebo případně i U1 snRNP s pre-mRNA (Makarov et al, 2012). Jakým

mechanismem jsou tyto interakce zprostředkovány a jestli vstupuje SMN do sestřihového komplexu samostatně nebo navázán na snRNP, zatím není vůbec jasné. Každopádně je přítomnost SMN pouze krátkodobá a je uvolněn během formování dalšího stupně komplexu (Behzadnia et al, 2007; Makarov et al, 2012).

V komplexu A je už U2 snRNP inkorporována stabilně, její snRNA je spárována s pre-mRNA v místě větvení a celá vazba je zajištěna SF3 proteiny (Behzadnia et al, 2007; Will et al, 2001). Z místa větvení jsou poté uvolněny již nepotřebné SF1 a hPrp5 proteiny (Behzadnia et al, 2007; Deckert et al, 2006). Kromě U1 a U2 specifických proteinů obsahuje komplex v tomto stádiu přes 50 dalších sestřihových faktorů, včetně proteinů hPrp19/CDC5 komplexu (Behzadnia et al, 2007). Následuje integrace U4/U6·U5 tri-snRNP, ke které je potřeba fosforylace hPrp28 (Mathew et al, 2008), a formuje se komplex B. Integrace je stabilizována fosforylací dalších dvou U4/U6·U5 tri-snRNP specifických proteinů, hPrp6 a hPrp31 (Schneider et al, 2010), a interakcí hPrp8 s U1 a U2 snRNA (Li et al, 2013). Celkově se komplex B skládá z více než 110 proteinů, má kosočtvercový tvar a v delším směru měří asi 420 Å (Deckert et al, 2006).

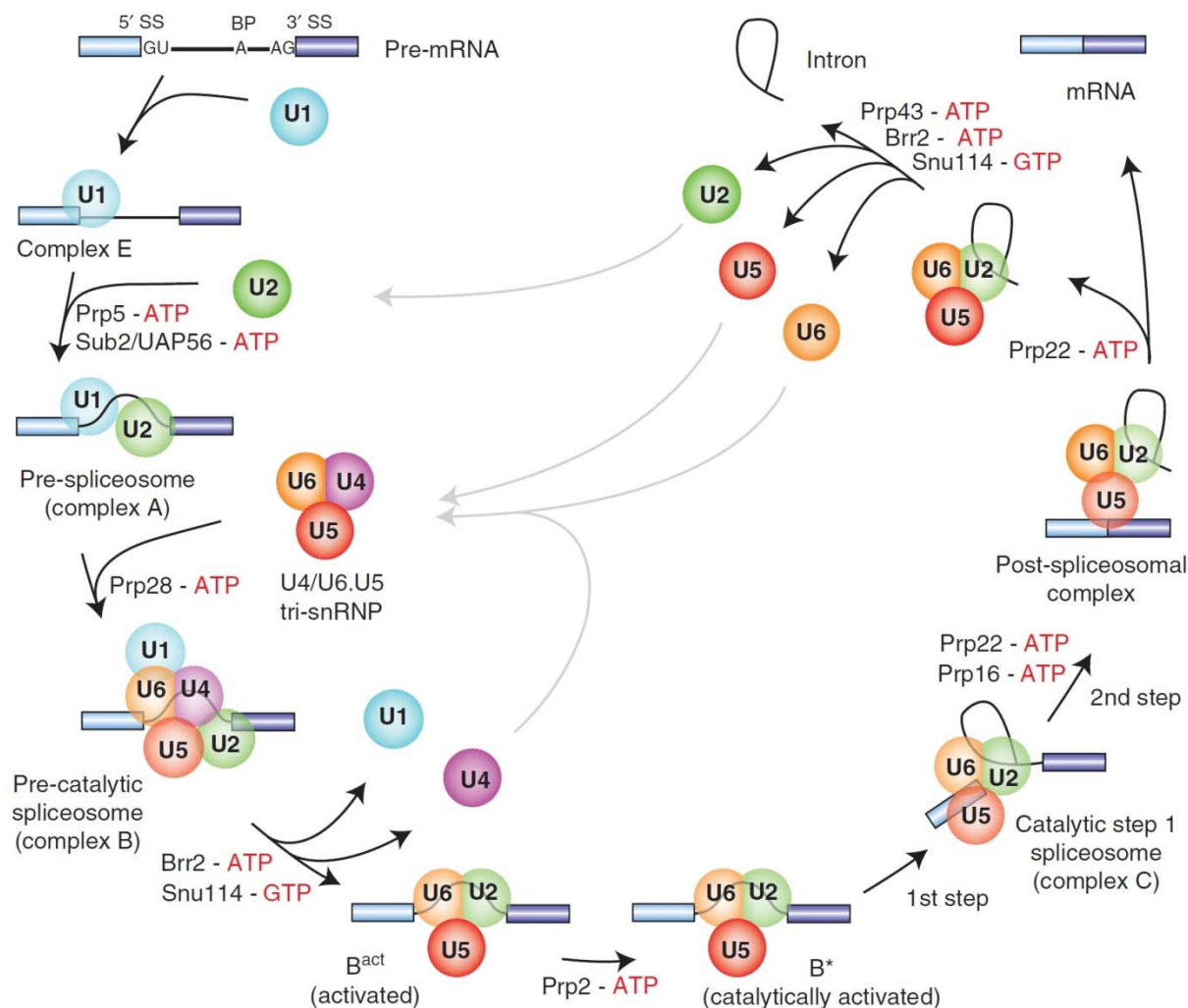
Ani tento obří komplex ale stále ještě není katalyticky aktivní. U5 specifický hPrp8 protein působí jako aktivační faktor na GTPázu hSnu114 a DExD/H helikázu hBrr2, které rozpojují vodíkové můstky mezi U4 a U6 snRNA (Liu et al, 2006; Maeder et al, 2009; Small et al, 2006). U6 snRNA nově páruje s U2 snRNA (Hausner et al, 1990) a 5' sestřihovým místem (Chan et al, 2003), čímž vytlačuje U1 snRNA a zároveň k sobě těsně přibližuje sestřihové místo a místo větvení. Ze sestřihového aparátu se uvolňuje U1 a U4 snRNP, U4/U6 specifické proteiny, hPrp28, hDip1 a mnoho dalších a vzniká aktivovaný komplex B<sup>act</sup> (Makarov et al, 2002; Makarova et al, 2004; Nottrott et al, 2002). Sestřihové komplexy kvasinek v tomto kroku opouští také všechny LSm proteiny (Chan et al, 2003), výsledky analýz lidských komplexů jsou ale v tomto ohledu velmi rozporuplné (Bessonov et al, 2008; Makarov et al, 2002; Makarova et al, 2004). Dále byla pozorována destabilizace U2 snRNP specifických SF3 proteinů (Bessonov et al, 2008; Yoshimoto et al, 2009), která však byla vyvrácena u kvasinkových modelů (Fourmann et al, 2013). Stabilizován je naopak hPrp19/CDC5 komplex, který hraje důležitou roli při právě popsaných přestavbách sestřihového aparátu a asociuje během nich s U5 částicí (Bessonov et al, 2008; Chan et al, 2003; Makarov et al, 2002).



Obr. 3: Proteinové složení sestřihových komplexů A, B a C. Komponenty označené tučným písmem jsou navázány stabilně, proteiny psané slabě byly nalezeny jen v malém množství a nejspíše asociují s komplexem pouze přechodně. Převzato z Wahl et al, 2009.

K úplné aktivaci musí  $B^{act}$  komplex podstoupit konformační změny řízené hPrp2, čímž se vytváří  $B^*$  komplex schopný katalyzovat první transesterifikační reakci (Kim & Lin, 1996). Pro sestřih je podstatná přítomnost hPrp8, který zřejmě interaguje s pre-mRNA a U2, U5 a U6 snRNA a staví je do pozic vhodných pro reakci (Li et al, 2013). Další stádium v cyklu sestřihové mašinerie, komplex C, zajišťuje druhý krok sestřihu, kterého se aktivně účastní protein hPrp22 (Bessonov et al, 2008). Na obrázku 3 jsou souhrnně znázorněné změny v proteinovém složení během přechodu od komplexu A až ke komplexu C.

Uvolnění úspěšně sestřižené mRNA z post-sestřihového komplexu zprostředkovává také hPrp22 (Schwer, 2008). Nakonec dojde k úplnému rozpadu komplexu na jednotlivé komponenty, což je nezbytný krok pro jejich následnou regeneraci. Navzdory neobvyklé složitosti procesu probíhá celý sestřih velice rychle – většinou bývá dokončen během 15 až 30 sekund od nasednutí U1 snRNP na nascentní transkript (Huranová et al, 2010). Velká část sestřihových proteinů, které mají klíčové funkce v přestavbách komplexu, patří mezi tzv. DExD/H ATPázy obsahující konzervovaný helikázový motiv. Z toho vyplývá, že tyto strukturní přestavby i samotný sestřih jsou poháněny energií z hydrolýzy ATP.



Obr. 4: Cyklus sestřihového komplexu. Pro jednoduchost jsou zakresleny pouze snRNP částice, ostatní sestřihové faktory na obrázku chybí. U šipek jsou zvýrazněny nejdůležitější DExD/H ATPázy a Snu114 GTPáza, které usnadňují konformační změny komplexu. Šedé šipky znázorňují recyklační kroky, které následují po sestřihu a jsou detailně popsány v následující kapitole. Obdélníčky představují exony, plná čára intron. Převzato z Will & Lührmann, 2011.



## 5 Recyklace sestřihových komponent

Ve všech fázích sestřihového cyklu se objevují řady nejasností, ale asi nejvíce neprobádaných míst skrývá recyklace malých jaderných ribonukleoproteinů. Ty se musí uvolnit z post-sestřihového komplexu a vrátit do své původní podoby, aby se mohly záhy účastnit dalších kol sestřihu. Po dokončení sestřihu využívá hPrp22 svoji helikázovou aktivitu k oddělení mRNA od U5 snRNA, čímž umožňuje odchod mRNA z komplexu (Schwer, 2008). Zbytek sestřihového aparátu se u kvasinek rozpadá na intron a jednotlivé snRNP v jediném kroku, který je katalyzován NTR komplexem (NTC related) složeným z proteinů Prp43, Ntr1 a Ntr2 (Fourmann et al, 2013; Martin et al, 2002; Tsai et al, 2005; Tsai et al, 2007). Ntr1 aktivuje Prp43, který provádí samotnou reakci (Tanaka et al, 2007). Není důvod domnívat se, že se v lidských buňkách uplatňuje jiný mechanismus, protože byl nalezen lidský homolog Ntr1, který interaguje s hPrp43 a zajišťuje uvolnění intronu (Yoshimoto et al, 2009). Zatím se však nepodařilo identifikovat lidský protějšek Ntr2 proteinu a je možné, že lidské komplexy fungují bez něj.

K rozpadu je nutný ještě Brr2, který s pomocí Snu114 rozplétá U2/U6 snRNA duplex – obdobně jako v případě U4/U6 snRNA během aktivace sestřihového komplexu (Small et al, 2006). Kooperace mezi Brr2 a NTR komplexem může být podpořena jejich vzájemnou interakcí (Tsai et al, 2007). Nedávno vydaná práce J.-B. Fourmanna a jeho kolegů však přímou roli Brr2 a Snu114 v disociaci U2/U6-U5-intron komplexu překvapivě vyvrací. Přestože pozorovali purifikované kvasinkové systémy za stejných podmínek jako skupina E. C. Small, jejich výsledky se zásadně liší. Tato protichůdná pozorování by mohla být vysvětlena odlišnými metodami purifikace komplexů. Není tedy vyloučeno, že má Brr2 v rozpadu komplexu pouze nepřímou nebo pomocnou funkci (Fourmann et al, 2013). Informace o lidských proteinech hBrr2 a hSnu114 jsou bohužel ještě mlhavější. Každopádně je komplex nejspíše rozvolněn na samostatné U2, U5 a U6 částice a na intron, na kterém zůstávají navázané některé proteiny (Yoshimoto et al, 2009).

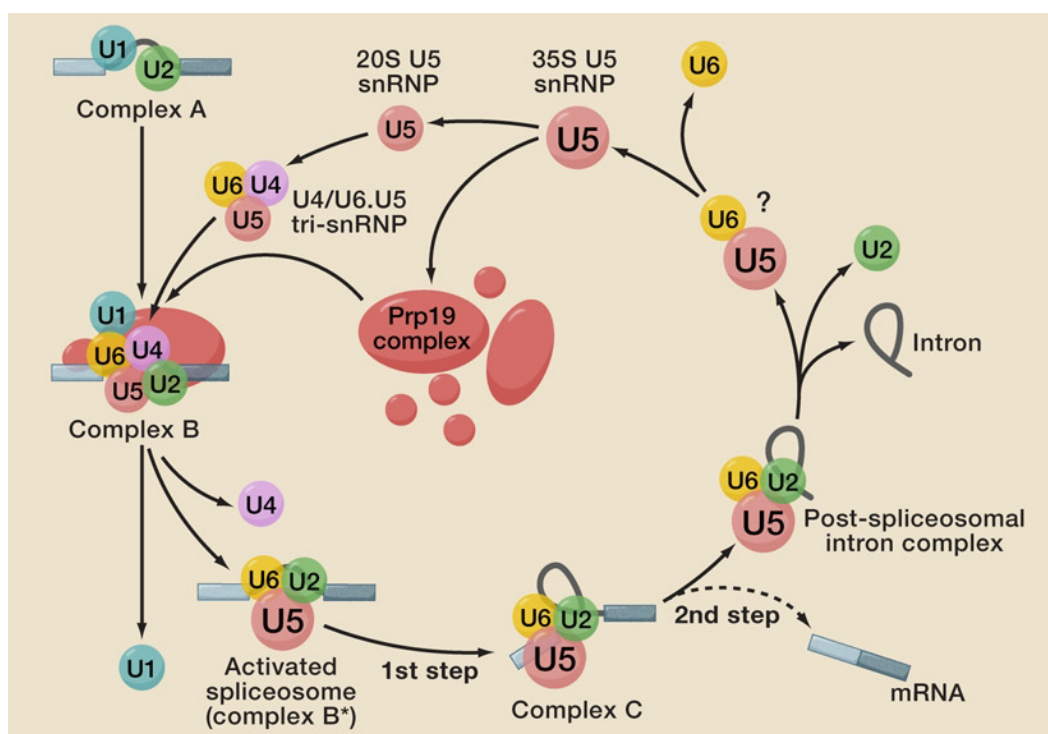
Nejvýraznější změny během sestřihu pre-mRNA podstupují U5 snRNP a U4/U6 di-snRNP. Pokud U6 částice opravdu opouští komplex bez LSm proteinů (Bessonov et al, 2008; Makarov et al, 2002), tzn. jako samotná snRNA, pak je nutné, aby byl LSm prstenec co nejrychleji obnoven. Jeho přítomnost totiž zajišťuje stabilitu U6 snRNA (Salgado-Garrido

et al, 1999) a je zásadní pro recyklaci částice a tím pádem i celého sestřihového komplexu (Verdone et al, 2004), což napovídá, že zde plní stejnou úlohu jako při biogenezi. Vzhledem k tomu, že celá maturace U6 snRNP probíhá v jádře, by však tato regenerace nemusela představovat velkou komplikaci. Role v U6 snRNP a U4/U6 di-snRNP recyklaci byla překvapivě přisouzena i hPrp19/CDC5 komplexu (Chen et al, 2006), není ale jisté, jakým způsobem by měl do regenerace zasahovat.

Proteinové složení samostatné U4 snRNP není příliš dobře prozkoumáno, takže není jasné, zda musí procházet nějakými úpravami nebo jestli se shoduje s nově vytvořenými snRNP. Každopádně vše nasvědčuje tomu, že U4/U6 di-snRNP je vytvářena stejně jako poprvé. Obnovení párování bází mezi U4 a U6 snRNA je zprostředkováno opět SART3 (Bell et al, 2002) a odehrává se v Cajalových tělískách, kde se U4/U6 di-snRNP akumuluje a čeká na příchod U5 snRNP (Staněk et al, 2008). 35S U5 snRNP uvolněná po sestřihu obsahuje proteiny hPrp19/CDC5 komplexu a naopak postrádá čtyři z původních osmi U5 specifických proteinů – hPrp6, hPrp28, 52K a hDib1 (Makarov et al, 2002; Yoshimoto et al, 2009). Proto musí před dalším kolem sestřihu dojít k rozsáhlé přestavbě částice na výslednou 20S. Zatím ale není známý ani mechanismus tohoto procesu, ani místo, kde je prováděn. Dá se nicméně předpokládat, že probíhá v jaderných skvrnách nebo volně v nukleoplazmě, protože v Cajalových tělískách byly detekovány pouze 20S U5 snRNP. To by také mohl být důvod, proč je v nukleoplazmě a jaderných skvrnách koncentrován 52K protein, který disociuje z U5 snRNP během formování U4/U6·U5 tri-snRNP (Laggerbauer et al, 2005) a pak zde nejspíše čeká na recyklované a nově vytvářené snRNP. Hotová 20S U5 částice poté tedy vstupuje do CB, kde je začleněna do U4/U6·U5 tri-snRNP (Staněk et al, 2008) a následně do sestřihového aparátu. Celý cyklus U5 snRNP je zjednodušeně zachycen na obrázku 5.

Umístění tvorby sestřihových di-snRNP a tri-snRNP během recyklace i prvotní biogeneze do stejného jaderného kompartmentu může být pro buňku velmi výhodné. Není tak potřeba rozlišovat původ jednotlivých snRNP, lze u nich využít stejné mechanismy a nově vzniklé ribonukleoproteiny můžou jednoduše doplňovat ty recyklované a dokonce s nimi tvořit smíšené komplexy. K tomu všemu také nejspíše běžně dochází, protože snRNP vstupují do Cajalových tělísek zcela náhodně, setrvávají v nich jen velmi krátkou dobu a po návratu do nukleoplazmy asociují s jinými CB (Dundr et al, 2004; Rino et al, 2007; Staněk et al, 2008; Staněk et al, 2003). Tato dynamika je charakteristická pro všechny komponenty CB včetně

coilinu, který je z nich nejstabilnější a bývá zadržen v jednom tělísku na dvě až tři minuty (Dundr et al, 2004). Naprostá většina sestříhových snRNP v CB je tvořena maturovanými, regenerovanými částicemi a nově vznikající snRNP je pouze doplňují, ale nenahrazují. Tyto nové částice tvoří tak malou část z celkového počtu snRNP, že pokud je například zablokováno uvolňování U5 snRNP z post-sestříhových komplexů, nejsou de novo generované U5 schopné je efektivně nahradit (Staněk et al, 2008).



Obr. 5: Sestříhový cyklus z pohledu U5 snRNP. 20S částice během sestříhu asociuje s proteiny hPrp19/CDC5 komplexu a formuje 35S částici, která musí být následně recyklována. Převzato z Wahl et al, 2009.

Během aktivace sestříhového komplexu B a přechodu do komplexu C jsou mimo jiné destabilizovány U2 specifické SF3a a SF3b proteiny (Bessonov et al, 2008). I U2 snRNP tedy musí pravidelně procházet recyklačními úpravami, které se nejspíše odehrávají opět v Cajalových těliscích. Oproti tomu u U1 snRNP nebyly pozorovány žádné změny v proteinovém složení ani po asociaci s pre-mRNA, ani po jejím odchodu ze sestříhového aparátu. Zdá se tím pádem pravděpodobné, že uvolněná U1 snRNP částice může okamžitě rozeznávat další intron a iniciovat sestavení dalšího komplexu. Pokud tvoří většinu

sestříhových snRNP v CB recyklované částice, mohl by to být jeden z důvodů, proč se nedaří U1 snRNP v tělískách detekovat. Vzhledem k velkým nejasnostem v maturační dráze U1 snRNP jsou však takové závěry možná poněkud předčasné.

## 5.1 Role SMN v recyklaci

Již před 15 lety byly publikovány výsledky naznačující přímou roli SMN v recyklaci a sestavování sestříhového komplexu (Pellizzoni et al, 1998). Až nedávný objev SMN v purifikovaném časném komplexu E (Makarov et al, 2012) však nabízí vysvětlení. SMN komplex totiž zřejmě stabilizuje vazbu U1 a U2 snRNP na pre-mRNA a bez jeho přítomnosti je tvorba E komplexů inhibována (Makarov et al, 2012). Navíc je možné, že funkce SMN začíná ještě dříve a například pomáhá sestříhovým snRNP nasedat na introny nascentních transkriptů.

I samotný SMN ale podle běžně uznávaného modelu biogeneze snRNP vyžaduje recyklaci. Po cytoplazmatické fázi maturace je komplex SMN·snRNP importován zpět do jádra a následně do Cajalových tělísek. Zde SMN předává ribonukleoproteiny coilinu a sám by se měl vracet do cytoplazmy a zajišťovat biogenezi dalších snRNP. Nadbytečné a v danou chvíli nepotřebné SMN komplexy by se případně mohly ukládat v jaderných gemech. Tato teorie však nevysvětluje nečekaně dlouhou dobu, po kterou je SMN asociován v CB, aniž by zde byl držen interakcemi se snRNP nebo coilinem (Dundr et al, 2004; Staněk et al, 2008).

V poslední době se nicméně začínají objevovat důkazy popírající jaderný koimport SMN a sestříhových snRNP. Asi nejpersvědčivější je pozorování, že se značené SMN komplexy dostávají do jádra jinou rychlostí než snRNP (I. Novotný, nepublikovaná data). Toto tvrzení dále podporuje fakt, že po knockdownu SMN nedochází k akumulaci snRNP v cytoplazmě, což by se dalo očekávat, kdyby zde částice zůstaly uvězněné (Lemm et al, 2006; Shpargel & Matera, 2005). Také by zde bylo vhodné poznamenat, že kotransport SMN a snRNP byl objeven na U1 snRNP, která možná podstupuje trochu jinou maturační dráhu než ostatní sestříhové snRNP (Narayanan et al, 2004). Zajímavé je, že narušení cytoplazmatické biogeneze při absenci SMN, trimethylguanosin syntázy nebo PHAX vede k rozpadu Cajalových tělísek a coilin je roztroušen v nukleoplazmě a jadérku. To znamená, že integrita CB je závislá na správně probíhající maturaci nových snRNP, přestože tvoří jen malou část

sestřihových snRNP přítomných v CB (Girard et al, 2006; Lemm et al, 2006; Shpargel & Matera, 2005). K tomu se nabízí poměrně jednoduché vysvětlení – pokud je narušeno dodávání nových funkčních snRNP, dojde po určité době k poklesu celkové koncentrace snRNP a to má za následek rozpad tělísek (Sleeman et al, 2001; Staněk et al, 2008).

## 5.2 Minoritní sestřihové komplexy

Navzdory odlišné struktuře minoritních snRNA a částečně i proteinovému složení, platí pro biogenezi a recyklaci komplexů typu U12 nejspíše velmi podobné mechanismy jako u běžných sestřihových komplexů. Tato konzervovanost je nejnápadnější v případě U4atac/U6atac·U5 tri-snRNP, která sdílí s majoritní U4/U6·U5 částicí všechny di-snRNP i tri-snRNP specifické proteiny (Nottrott et al, 1999; Schneider et al, 2002) a sestavuje se ve stejném pořadí (Nottrott et al, 2002; Schneider et al, 2002). U6atac částice dokonce stejně jako U6 snRNP vyžaduje k recyklaci SART3, kupodivu ho ale váže jen jako samostatná mono-snRNP a ne ve formě U4atac/U6atac di-snRNP, jak je tomu u majoritních ribonukleo-proteinů (Damianov et al, 2004).

O něco větší rozdíly musí nutně být v cyklu U11/U12 di-snRNP, která je tvořena převážně unikátními proteiny (Will et al, 2004). Rozpoznání intronu a sestřih pre-mRNA jsou však zřejmě obdobné, protože U12 snRNP obsahuje komplex SF3b proteinů, které zajišťují stabilizaci vazby U2 snRNA na pre-mRNA v místě větvení (Will et al, 2004; Will et al, 2001). Po uvolnění ze sestřihového komplexu je třeba interakci mezi U11 a U12 snRNP obnovit. K tomu pravděpodobně dochází v Cajalových tělískách, neboť rozmístění obou částic v nukleoplazmě a akumulace v CB jsou shodné a zároveň odpovídají lokalizaci U2 snRNP (Matera & Ward, 1993). Takové řešení se zdá být logické – pokud je totiž princip sestřihu u majoritních a minoritních sestřihových aparátů stejný, pak musí U12 před každým sestřihem znovu asociovat s SF3b proteiny, což se děje právě v CB.

## 6 Závěr

Již od prvních objevů objasňujících složení, strukturu a princip sestavování sestřihových komplexů i jednotlivých snRNP se diskutuje o možnosti recyklace sestřihových komponent. Celý komplex by pak fungoval v navazujících sestřihových cyklech. Takové řešení by bylo pro buňku bezesporu výhodné, protože transkripce nových snRNA a syntéza sestřihových proteinů jsou energeticky náročné procesy a recyklací použitých částic se dá ušetřit nezanedbatelné množství energie. Regenerace ribonukleoproteinů je vhodná i z hlediska časové úspory, neboť (jak bylo popsáno v předchozích kapitolách) biogeneze snRNP probíhá velmi složitým mechanismem a musí proto trvat déle než pouhé obnovení už jednou sestavených snRNP. Ani není jisté, jestli by se vůbec potřebné množství částic stihlo včas syntetizovat, kdyby byly ty použité okamžitě degradovány – možná by v takovém případě byl sestřih výrazně pomalejší.

Obecně se předpokládá, že regenerace probíhá jen v nejnútnejší míře, tzn. že snRNA nemusí znovu podstupovat posttranskripční modifikace a Sm prstenec zůstává stabilně navázán po celou dobu sestřihového cyklu. Dokonce i některé snRNP specifické proteiny by mohly být zachovány, zatímco jiné, které se uvolňují během sestřihu nebo maturace částice, by musely asociovat před každým dalším kolem formování komplexu. Dá se usuzovat, že tyto proteiny (jde např. o U5 specifický 52K nebo U2 specifické SF3) jsou pouze znovu navázány a to nejspíše stejným způsobem jako poprvé. To by samozřejmě znamenalo, že regenerované částice můžou interagovat i s nově syntetizovanými proteiny a naopak.

Pro celou tuto hypotézu ale téměř chybí experimentální důkazy. Mezi pozorování, které ji nepřímou podporují, patří třeba fakt, že všechny snRNA mají poločas rozpadu v řádech desítek hodin (Fury & Zieve, 1996). Opravdu jasně je však zatím dokázáno vlastně jen to, že Cajalova tělíska obsahují převážně recyklované snRNP a že k formování U4/U6·U5 tri-snRNP, které se v nich odehrává, je nutná přítomnost částic uvolněných ze sestřihového komplexu (Staněk et al, 2008). Nedostatek experimentálních dat potvrzujících recyklaci je dán hlavně tím, že je poměrně složité odlišit nově vznikající a regenerované snRNP. Nyní by bylo velice zajímavé zjistit, kolikrát jsou sestřihové ribonukleoproteiny recyklovány a jak dlouho můžou normálně zajišťovat sestřih, pokud je zablokována biogeneze nových částic. Dále je potřeba objasnit transformaci 35S U5 snRNP uvolněných ze sestřihového komplexu na 20S

částice, maturaci a případnou regeneraci U1 a U4 snRNP a mnoho dalších procesů sestřihového cyklu, které jsou prozatím jen velmi mlhavé. To je ale nejspíše otázka ještě mnoha let výzkumu.

## Přehled použité literatury

- Achsel T, Brahms H, Kastner B, Bachi A, Wilm M, Lührmann R (1999) A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. *EMBO J* **18**: 5789-5802
- Behzadnia N, Golas MM, Hartmuth K, Sander B, Kastner B, Deckert J, Dube P, Will CL, Urlaub H, Stark H, Lührmann R (2007) Composition and three-dimensional EM structure of double affinity-purified, human prespliceosomal A complexes. *EMBO J* **26**: 1737-1748
- Bell M, Schreiner S, Damianov A, Reddy R, Bindereif A (2002) p110, a novel human U6 snRNP protein and U4/U6 snRNP recycling factor. *EMBO J* **21**: 2724-2735
- Bessonov S, Anokhina M, Will CL, Urlaub H, Lührmann R (2008) Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature* **452**: 846-850
- Black DL, Pinto AL (1989) U5 small nuclear ribonucleoprotein: RNA structure analysis and ATP-dependent interaction with U4/U6. *Mol Biol Cell* **9**: 3350-3359
- Booth BL, Pugh BF (1997) Identification and characterization of a nuclease specific for the 3' end of the U6 small nuclear RNA. *J Biol Chem* **272**: 984-991
- Bouveret E, Rigaut G, Shevchenko A, Wilm M, Séraphin B (2000) A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *EMBO J* **19**: 1661-1671
- Branlant C, Krol A, Ebel J-P, Lazar E, Haendler B, Jacobl M (1982) U2 RNA shares a structural domain with U1, U4, and U5 RNAs. *EMBO J* **1**: 1259-1265
- Bringmann P, Appel B, Rinke J, Reuter R, Theissen H, Lührmann R (1984) Evidence for the existence of snRNAs U4 and U6 in a single ribonucleoprotein complex and for their association by intermolecular base pairing. *EMBO J* **3**: 1357-1363
- Buckingham M, Liu JL (2011) U bodies respond to nutrient stress in Drosophila. *Exp Cell Res* **317**: 2835-2844
- Burge CB, Padgett RA, Sharp PA (1998) Evolutionary fates and origins of U12-type introns. *Mol Cell* **2**: 773-785
- Carmo-Fonseca M, Ferreira J, Lamond AI (1993) Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis - evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure. *J Cell Biol* **120**: 841-852
- Carvalho T, Almeida F, Calapez A, Lafarga M, Berciano MT, Carmo-Fonseca M (1999) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *J Cell Biol* **147**: 715-728
- Cauchi RJ, Sanchez-Pulido L, Liu JL (2010) Drosophila SMN complex proteins Gemin2, Gemin3, and Gemin5 are components of U bodies. *Exp Cell Res* **316**: 2354-2364



- Côté J, Richard S (2005) Tudor domains bind symmetrical dimethylated arginines. *J Biol Chem* **280**: 28476-28483
- Damianov A, Schreiner S, Bindereif A (2004) Recycling of the U12-type spliceosome requires p110, a component of the U6atac snRNP. *Mol Cell Biol* **24**: 1700-1708
- Darzacq X, Jády BE, Verheggen C, Kiss AM, Bertrand E, Kiss T (2002) Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *EMBO J* **21**: 2746-2756
- Deckert J, Hartmuth K, Boehringer D, Behzadnia N, Will CL, Kastner B, Stark H, Urlaub H, Lührmann R (2006) Protein composition and electron microscopy structure of affinity-purified human spliceosomal B complexes isolated under physiological conditions. *Mol Cell Biol* **26**: 5528-5543
- Dundr M, Hebert MD, Karpova TS, Staněk D, Xu H, Shpargel KB, Meier UT, Neugebauer KM, Matera AG, Misteli T (2004) In vivo kinetics of Cajal body components. *J Cell Biol* **164**: 831-842
- Fourmann JB, Schmitzová J, Christian H, Urlaub H, Ficner R, Boon KL, Fabrizio P, Lührmann R (2013) Dissection of the factor requirements for spliceosome disassembly and the elucidation of its dissociation products using a purified splicing system. *Genes Dev* **27**: 413-428
- Fury M, Zieve G (1996) U6 snRNA maturation and stability. *Exp Cell Res* **228**: 160-163
- Galej WP, Oubridge C, Newman AJ, Nagai K (2013) Crystal structure of Prp8 reveals active site cavity of the spliceosome. *Nature* **493**: 638-643
- Ganot P, Jády BE, Bortolin M-L, Darzacq X, Kiss T (1999) Nucleolar factors direct the 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of U6 spliceosomal RNA. *Mol Cell Biol* **19**: 6906-6917
- Girard C, Neel H, Bertrand E, Bordonné R (2006) Depletion of SMN by RNA interference in HeLa cells induces defects in Cajal body formation. *Nucleic Acids Res* **34**: 2925-2932
- Golas MM, Sander B, Will CL, Lührmann R, Stark H (2003) Molecular architecture of the multiprotein splicing factor SF3b. *Science* **300**: 980-984
- Golas MM, Sander B, Will CL, Lührmann R, Stark H (2005) Major conformational change in the complex SF3b upon integration into the spliceosomal U11/U12 di-snRNP as revealed by electron cryomicroscopy. *Mol Cell* **17**: 869-883
- Grimm C, Chari A, Pelz JP, Kuper J, Kisker C, Diederichs K, Stark H, Schindelin H, Fischer U (2013) Structural basis of assembly chaperone-mediated snRNP formation. *Mol Cell* **49**: 692-703
- Gu J, Shumyatsky G, Makan N, Reddy R (1997) Formation of 2',3'-cyclic phosphates at the 3' end of human U6 small nuclear RNA in vitro. Identification of 2',3'-cyclic phosphates at the 3' ends of human signal recognition particle and mitochondrial RNA processing RNAs. *J Biol Chem* **272**: 21989-21993

- Harada K, Yamada A, Yang D, Itoh K, Shichijo S (2001) Binding of a SART3 tumor-rejection antigen to a pre-mRNA splicing factor RNPS1: a possible regulation of splicing by a complex formation. *Int J Cancer* **93**: 623-628
- Hausner TP, Giglio LM, Weiner AM (1990) Evidence for base-pairing between mammalian U2 and U6 small nuclear ribonucleoprotein particles. *Genes Dev* **4**: 2146-2156
- Hebert MD, Shpargel KB, Ospina JK, Tucker KE, Matera AG (2002) Coilin methylation regulates nuclear body formation. *Dev Cell* **3**: 329-337
- Hermann H, Fabrizio P, Raker VA, Foulaki K, Hornig H, Brahms H, Lührmann R (1995) snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions. *EMBO J* **14**: 2076-2088
- Huber J, Dickmanns A, Lührmann R (2002) The importin-beta binding domain of snurportin1 is responsible for the Ran- and energy-independent nuclear import of spliceosomal U snRNPs in vitro. *J Cell Biol* **156**: 467-479
- Huranová M, Ivani I, Benda A, Poser I, Brody Y, Hof M, Shav-Tal Y, Neugebauer KM, Staněk D (2010) The differential interaction of snRNPs with pre-mRNA reveals splicing kinetics in living cells. *J Cell Biol* **191**: 75-86
- Chan SP, Kao DI, Tsai WY, Cheng SC (2003) The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. *Science* **302**: 279-282
- Chen CH, Kao DI, Chan SP, Kao TC, Lin JY, Cheng SC (2006) Functional links between the Prp19-associated complex, U4/U6 biogenesis, and spliceosome recycling. *RNA* **12**: 765-774
- Chu JL, Elkon KB (1991) The small nuclear ribonucleoproteins, SmB and B', are products of a single gene. *Gene* **97**: 311-312
- Izaurrealde E, Lewis J, Gamberi C, Jarmolowski A, McGuigan C, Mattaj IW (1995) A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature* **376**: 709-712
- Jády BE, Darzacq X, Tucker KE, Matera AG, Bertrand E, Kiss T (2003) Modification of Sm small nuclear RNAs occurs in the nucleoplasmic Cajal body following import from the cytoplasm. *EMBO J* **22**: 1878-1888
- Kambach C, Walke S, Young R, Avis JM, de la Fortelle E, Raker VA, Lührmann R, Li J, Nagai K (1999) Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs. *Cell* **96**: 375-387
- Kim SH, Lin RJ (1996) Spliceosome activation by PRP2 ATPase prior to the first transesterification reaction of pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* **16**: 6810-6819
- Kitao S, Segref A, Kast J, Wilm M, Mattaj IW, Ohno M (2008) A compartmentalized phosphorylation/dephosphorylation system that regulates U snRNA export from the nucleus. *Mol Cell Biol* **28**: 487-497

- Klingauf M, Staněk D, Neugebauer KM (2006) Enhancement of U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle association in Cajal bodies predicted by mathematical modeling. *Mol Biol Cell* **17**: 4972-4981
- Laggerbauer B, Liu S, Makarov EM, Vornlocher H-P, Makarova OV, Ingelfinger D, Achsel T, Lührmann R (2005) The human U5 snRNP 52K protein (CD2BP2) interacts with U5-102K (hPrp6), a U4/U6.U5 tri-snRNP bridging protein, but dissociates upon tri-snRNP formation. *RNA* **11**: 598-608
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, et al (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921
- Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* **80**: 155-165
- Lemm I, Girard C, Kuhn AN, Watkins NJ, Schneider M, Bordonné R, Lührmann R (2006) Ongoing U snRNP biogenesis is required for the integrity of Cajal bodies. *Mol Biol Cell* **17**: 3221-3231
- Leung AK, Nagai K, Li J (2011) Structure of the spliceosomal U4 snRNP core domain and its implication for snRNP biogenesis. *Nature* **473**: 536-539
- Levine A, Durbin R (2001) A computational scan for U12-dependent introns in the human genome sequence. *Nucleic Acids Res* **29**: 4006-4013
- Li X, Zhang W, Xu T, Ramsey J, Zhang L, Hill R, Hansen KC, Hesselberth JR, Zhao R (2013) Comprehensive in vivo RNA-binding site analyses reveal a role of Prp8 in spliceosomal assembly. *Nucleic Acids Res* **41**: 3805-3818
- Licht K, Medenbach J, Lührmann R, Kambach C, Bindereif A (2008) 3'-cyclic phosphorylation of U6 snRNA leads to recruitment of recycling factor p110 through LSm proteins. *RNA* **14**: 1532-1538
- Lin PC, Xu RM (2012) Structure and assembly of the SF3a splicing factor complex of U2 snRNP. *EMBO J* **31**: 1579-1590
- Liu JL, Gall JG (2007) U bodies are cytoplasmic structures that contain uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins and associate with P bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 11655-11659
- Liu Q, Dreyfuss G (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J* **15**: 3555-3565
- Liu S, Li P, Dybkov O, Nottrott S, Hartmuth K, Lührmann R, Carlomagno T, Wahl MC (2007) Binding of the human Prp31 Nop domain to a composite RNA-protein platform in U4 snRNP. *Science* **316**: 115-120
- Liu S, Rauhut R, Vornlocher HP, Lührmann R (2006) The network of protein-protein interactions within the human U4/U6.U5 tri-snRNP. *RNA* **12**: 1418-1430

- Liu Y, Li J, Kim BO, Pace BS, He JJ (2002) HIV-1 Tat protein-mediated transactivation of the HIV-1 long terminal repeat promoter is potentiated by a novel nuclear Tat-interacting protein of 110 kDa, Tip110. *J Biol Chem* **277**: 23854-23863
- Maeder C, Kutach AK, Guthrie C (2009) ATP-dependent unwinding of U4/U6 snRNAs by the Brr2 helicase requires the C terminus of Prp8. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 42-48
- Makarov EM, Makarova OV, Urlaub H, Gentzel M, Will CL, Wilm M, Lührmann R (2002) Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science* **298**: 2205-2208
- Makarov EM, Owen N, Bottrill A, Makarova OV (2012) Functional mammalian spliceosomal complex E contains SMN complex proteins in addition to U1 and U2 snRNPs. *Nucleic Acids Res* **40**: 2639-2652
- Makarova OV, Makarov EM, Liu S, Vornlocher H-P, Lührmann R (2002) Protein 61K, encoded by a gene (PRPF31) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6\*U5 tri-snRNP formation and pre-mRNA splicing. *EMBO J* **21**: 1148-1157
- Makarova OV, Makarov EM, Urlaub H, Will CL, Gentzel M, Wilm M, Lührmann R (2004) A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to catalytic step 1 of splicing. *EMBO J* **23**: 2381-2391
- Martin A, Schneider S, Schwer B (2002) Prp43 is an essential RNA-dependent ATPase required for release of lariat-intron from the spliceosome. *J Biol Chem* **277**: 17743-17750
- Massenet S, Pellizzoni L, Paushkin S, Mattaj IW, Dreyfuss G (2002) The SMN complex is associated with snRNPs throughout their cytoplasmic assembly pathway. *Mol Cell Biol* **22**: 6533-6541
- Matera AG, Ward DC (1993) Nucleoplasmic organization of small nuclear ribonucleoproteins in cultured human cells. *J Cell Biol* **121**: 715-727
- Mathew R, Hartmuth K, Möhlmann S, Urlaub H, Ficner R, Lührmann R (2008) Phosphorylation of human PRP28 by SRPK2 is required for integration of the U4/U6-U5 tri-snRNP into the spliceosome. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 435-443
- Mayes AE, Verdone L, Legrain P, Beggs JD (1999) Characterization of Sm-like proteins in yeast and their association with U6 snRNA. *EMBO J* **18**: 4321-4331
- Medenbach J, Schreiner S, Liu S, Lührmann R, Bindereif A (2004) Human U4/U6 snRNP recycling factor p110: mutational analysis reveals the function of the tetratricopeptide repeat domain in recycling. *Mol Cell Biol* **24**: 7392-7401
- Meister G, Bühler D, Lagerbauer B, Zobawa M, Lottspeich F, Fischer U (2000) Characterization of a nuclear 20S complex containing the survival of motor neurons (SMN) protein and a specific subset of spliceosomal Sm proteins. *Hum Mol Genet* **9**: 1977-1986
- Misteli T, Cáceres J, Spector D (1997) The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* **387**: 523-527

- Mouaikel J, Narayanan U, Verheggen C, Matera AG, Bertrand E, Tazi J, Bordonne R (2003) Interaction between the small-nuclear-RNA cap hypermethylase and the spinal muscular atrophy protein, survival of motor neuron. *EMBO Rep* **4**: 616-622
- Narayanan U, Achsel T, Luhrmann R, Matera AG (2004) Coupled in vitro import of U snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Mol Cell* **16**: 223-234
- Narayanan U, Ospina JK, Frey MR, Hebert MD, Gregory A (2002) SMN, the spinal muscular atrophy protein, forms a pre-import snRNP complex with snurportin1 and importin beta. *Hum Mol Genet* **11**: 1785-1795
- Nelissen RL, Will CL, van Venrooij WJ, Lührmann R (1994) The association of the U1-specific 70K and C proteins with U1 snRNPs is mediated in part by common U snRNP proteins. *EMBO J* **13**: 4113-4125
- Nesic D, Tanackovic G, Krämer A (2004) A role for Cajal bodies in the final steps of U2 snRNP biogenesis. *J Cell Sci* **117**: 4423-4433
- Nottrott S, Hartmuth K, Fabrizio P, Urlaub H, Vidovic I, Ficner R, Lührmann R (1999) Functional interaction of a novel 15.SkD [U4/U6.U5] tri-snRNP protein with the 5' stem-loop of U4 snRNA. *EMBO J* **18**: 6119-6133
- Nottrott S, Urlaub H, Lührmann R (2002) Hierarchical, clustered protein interactions with U4/U6 snRNA: a biochemical role for U4/U6 proteins. *EMBO J* **21**: 5527-5538
- Novotný I, Blažíková M, Staněk D, Herman P, Malinsky J (2011) In vivo kinetics of U4/U6.U5 tri-snRNP formation in Cajal bodies. *Mol Biol Cell* **22**: 513-523
- Novotný I, Podolská K, Blažíková M, Valášek LS, Svoboda P, Staněk D (2012) Nuclear LSM8 affects number of cytoplasmic processing bodies via controlling cellular distribution of Like-Sm proteins. *Mol Biol Cell* **23**: 3776-3785
- Ohno M, Segref A, Bachi A, Wilm M, Mattaj JW (2000) PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* **101**: 187-198
- Patel AA, McCarthy M, Steitz JA (2002) The splicing of U12-type introns can be a rate-limiting step in gene expression. *EMBO J* **21**: 3804-3815
- Pellizzoni L, Charroux B, Dreyfuss G (1999) SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 11167-11172
- Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, Dreyfuss G (1998) A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* **95**: 615-624
- Pellizzoni L, Yong J, Dreyfuss G (2002) Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science* **298**: 1775-1779
- Pena V, Jovin SM, Fabrizio P, Orlowski J, Bujnicki JM, Lührmann R, Wahl MC (2009) Common design principles in the spliceosomal RNA helicase Brr2 and in the Hel308 DNA helicase. *Mol Cell* **35**: 454-466

- Pomeranz Krummel DA, Oubridge C, Leung AK, Li J, Nagai K (2009) Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 Å resolution. *Nature* **458**: 475-480
- Price SR, Evans PR, Nagai K (1998) Crystal structure of the spliceosomal U2B''-U2A' protein complex bound to a fragment of U2 small nuclear RNA. *Nature* **394**: 645-650
- Raker VA, Hartmuth K, Kastner B, Lührmann R (1999) Spliceosomal U snRNP core assembly: Sm proteins assemble onto an Sm site RNA nonanucleotide in a specific and thermodynamically stable manner. *Mol Cell Biol* **19**: 6554-6565
- Raker VA, Plessel G, Lührmann R (1996) The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro. *EMBO J* **15**: 2256-2269
- Raška I, Andrade LEC, Ochs RL, Chan EKL, Chang CM, Roos G, Tan EM (1991) Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. *Exp Cell Res* **195**: 27-37
- Reddy R, Ro-Choi TS, Henning D, Busch H (1974) Primary sequence of U-1 nuclear ribonucleic acid of Novikoff hepatoma ascites cells. *J Biol Chem* **249**: 6486-6494
- Rino J, Carvalho T, Braga J, Desterro JMP, Lührmann R, Carmo-Fonseca M (2007) A stochastic view of spliceosome assembly and recycling in the nucleus. *PLoS Comput Biol* **3**: 2019-2031
- Salgado-Garrido J, Bragado-Nilsson E, Kandels-Lewis S, Séraphin B (1999) Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin. *EMBO J* **18**: 3451-3462
- Sander B, Golas MM, Makarov EM, Brahms H, Kastner B, Lührmann R, Stark H (2006) Organization of core spliceosomal components U5 snRNA loop I and U4/U6 di-snRNP within U4/U6.U5 tri-snRNP as revealed by electron cryomicroscopy. *Mol Cell* **24**: 267-278
- Segref A, Mattaj IW, Ohno M (2001) The evolutionarily conserved region of the U snRNA export mediator PHAX is a novel RNA-binding domain that is essential for U snRNA export. *RNA* **7**: 351-360
- Selenko P, Sprangers R, Stier G, Bühler D, Fischer U, Sattler M (2001) SMN tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nat Struct Biol* **8**: 27-31
- Shimba S, Reddy R (1994) Purification of human U6 small nuclear RNA capping enzyme. Evidence for a common capping enzyme for gamma-monomethyl-capped small RNAs. *J Biol Chem* **269**: 12419-12423
- Shpargel KB, Matera AG (2005) Gemin proteins are required for efficient assembly of Sm-class ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 17372-17377
- Schaffert N, Hossbach M, Heintzmann R, Achsel T, Lührmann R (2004) RNAi knockdown of hPrp31 leads to an accumulation of U4/U6 di-snRNPs in Cajal bodies. *EMBO J* **23**: 3000-3009
- Scherer S (2008) A Short Guide to the Human Genome. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*

- Schneider C, Will CL, Makarova OV, Makarov EM, Lührmann R (2002) Human U4/U6.U5 and U4atac/U6atac.U5 tri-snRNPs exhibit similar protein compositions. *Mol Cell Biol* **22**: 3219-3229
- Schneider M, Hsiao H-H, Will CL, Giet R, Urlaub H, Lührmann R (2010) Human PRP4 kinase is required for stable tri-snRNP association during spliceosomal B complex formation. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 216-221
- Schwer B (2008) A conformational rearrangement in the spliceosome sets the stage for Prp22-dependent mRNA release. *Mol Cell* **30**: 743-754
- Singh R, Reddy R (1989) Gamma-monomethyl phosphate: a cap structure in spliceosomal U6 small nuclear RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 8280-8283
- Sleeman JE, Ajuh P, Lamond AI (2001) snRNP protein expression enhances the formation of Cajal bodies containing p80-coilin and SMN. *J Cell Sci* **114**: 4407-4419
- Sleeman JE, Lamond AI (1999) Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway. *Curr Biol* **9**: 1065-1074
- Small EC, Leggett SR, Winans AA, Staley JP (2006) The EF-G-like GTPase Snu114p regulates spliceosome dynamics mediated by Brr2p, a DExD/H box ATPase. *Mol Cell* **23**: 389-399
- Staněk D, Neugebauer KM (2004) Detection of snRNP assembly intermediates in Cajal bodies by fluorescence resonance energy transfer. *J Cell Biol* **166**: 1015-1025
- Staněk D, Přidalová-Hnilicová J, Novotný I, Huranová M, Blažíková M, Wen X, Sapra AK, Neugebauer KM (2008) Spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles repeatedly cycle through Cajal bodies. *Mol Biol Cell* **19**: 2534-2543
- Staněk D, Rader SD, Klingauf M, Neugebauer KM (2003) Targeting of U4/U6 small nuclear RNP assembly factor SART3/p110 to Cajal bodies. *J Cell Biol* **160**: 505-516
- Tanackovic G, Krämer A (2005) Human splicing factor SF3a, but not SF1, is essential for pre-mRNA splicing in vivo. *Mol Biol Cell* **16**: 1366-1377
- Tanaka N, Aronova A, Schwer B (2007) Ntr1 activates the Prp43 helicase to trigger release of lariatintron from the spliceosome. *Genes Dev* **21**: 2312-2325
- Trippe R, Guschina E, Hossbach M, Urlaub H, Lührmann R, Benecke BJ (2006) Identification, cloning, and functional analysis of the human U6 snRNA-specific terminal uridylyl transferase. *RNA* **12**: 1494-1504
- Tsai RT, Fu RH, Yeh FL, Tseng CK, Lin YC, Huang YH, Cheng SC (2005) Spliceosome disassembly catalyzed by Prp43 and its associated components Ntr1 and Ntr2. *Genes Dev* **19**: 2991-3003
- Tsai RT, Tseng CK, Lee PJ, Chen HC, Fu RH, Chang KJ, Yeh FL, Cheng SC (2007) Dynamic interactions of Ntr1-Ntr2 with Prp43 and with U5 govern the recruitment of Prp43 to mediate spliceosome disassembly. *Mol Cell Biol* **27**: 8027-8037

- Tucker K, Berciano M, Jacobs E, LePage D, Shpargel K, Rossire J, Chan E, Lafarga M, Conlon R, Matera A (2001) Residual Cajal bodies in coilin knockout mice fail to recruit Sm snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy gene product. *J Cell Biol* **154**: 293-308
- Verdone L, Galardi S, Page D, Beggs JD (2004) Lsm proteins promote regeneration of pre-mRNA splicing activity. *Curr Biol* **14**: 1487-1491
- Vidal VPI, Verdone L, Mayes AE, Beggs JD (1999) Characterization of U6 snRNA-protein interactions. *RNA* **5**: 1470-1481
- Wahl MC, Will CL, Lührmann R (2009) The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**: 701-718
- Wassarman KM, Steitz JA (1992) The low-abundance U11 and U12 small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) interact to form a two-snRNP complex. *Mol Cell Biol* **12**: 1276-1285
- Weber G, Trowitzsch S, Kastner B, Lührmann R, Wahl MC (2010) Functional organization of the Sm core in the crystal structure of human U1 snRNP. *EMBO J* **29**: 4172-4184
- Will CL, Lührmann R (2011) Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**
- Will CL, Schneider C, Hossbach M, Urlaub H, Rauhut R, Elbashir S, Tuschl T, Lührmann R (2004) The human 18S U11/U12 snRNP contains a set of novel proteins not found in the U2-dependent spliceosome. *RNA* **10**: 929-941
- Will CL, Schneider C, MacMillan AM, Katopodis NF, Neubauer G, Wilm M, Lührmann R, Query CC (2001) A novel U2 and U11/U12 snRNP protein that associates with the pre-mRNA branch site. *EMBO J* **20**: 4536-4546
- Will CL, Urlaub H, Achsel T, Gentzel M, Wilm M, Lührmann R (2002) Characterization of novel SF3b and 17S U2 snRNP proteins, including a human Prp5p homologue and an SF3b DEAD-box protein. *EMBO J* **21**: 4978-4988
- Xu H, Pillai RS, Azzouz TN, Shpargel KB, Kambach C, Hebert MD, Schumperli D, Matera AG (2005) The C-terminal domain of coilin interacts with Sm proteins and U snRNPs. *Chromosoma* **114**: 155-166
- Yang D, Nakao M, Shichijo S, Sasatomi T, Takasu H, Matsumoto H, Mori K, Hayashi A, Yamana H, Shirouzu K, Itoh K (1999) Identification of a gene coding for a protein possessing shared tumor epitopes capable of inducing HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes in cancer patients. *Cancer Res* **59**: 4056-4063
- Yoshimoto R, Kataoka N, Okawa K, Ohno M (2009) Isolation and characterization of post-splicing lariat-intron complexes. *Nucleic Acids Res* **37**: 891-902
- Zhang L, Xu T, Maeder C, Bud LO, Shanks J, Nix J, Guthrie C, Pleiss JA, Zhao R (2009) Structural evidence for consecutive Hel308-like modules in the spliceosomal ATPase Brr2. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 731-739
- Zhang R, So BR, Li P, Yong J, Glisovic T, Wan L, Dreyfuss G (2011) Structure of a key intermediate of the SMN complex reveals Gemin2's crucial function in snRNP assembly. *Cell* **146**: 384-395